



## 線虫C. elegansを用いた静水圧負荷に伴う生物応答の研究

著者	渡辺 尚
号	17
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第396号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00127802">http://hdl.handle.net/10097/00127802</a>

東北大学第64号

# 博士論文内容の要旨及び 審査結果の要旨

生命科学第17集（課程博士）

（令和元年度授与）

東 北 大 学

令 和 元 年 度

氏名	わたなべ なおし		
学 位 の 種 類	渡辺 尚		
学 位 記 番 号	博士（生命科学）		
学位授与年月日	生博第396号		
学位授与の要件	令和2年3月25日		
研 究 科 , 専 攻	学位規則第4条第1項該当		
論 文 題 目	東北大学大学院生命科学研究科		
	(博士課程) 生態システム生命科学専攻		
博士論文審査委員	線虫 <i>C. elegans</i> を用いた静水圧負荷に伴う生物応答の研究		
	(主査)	教授	東谷 篤志
		教授	高橋 秀幸
		教授	渡辺 正夫

## 論文内容の要旨

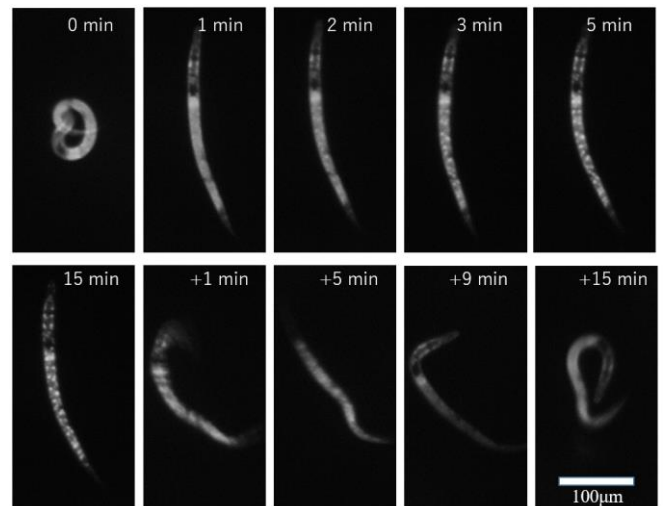
### 【背景・目的】

歩行・運動・咀嚼などの行動には、大気圧条件である 0.1MPa よりもその 10 倍から数百倍の大きさである 1MPa～数十 MPa（メガパスカル）単位の静水圧（以下、生理的静水圧とする）の負荷がかかっている。すなわち筋、骨、関節や歯茎など様々な組織や器官において、我々は単発的あるいは持続的に生理的静水圧の負荷を受けながら生命活動を日々営んでいる。このように通常の生活で身近なメカノストレスの 1 つである生理的静水圧の負荷は、これら組織や器官の恒常性の維持や強化に不可欠であることが知られている。これまでの研究により、生理的静水圧の負荷が軟骨ならびにその細胞においてマトリックスタンパク質や血管内皮増殖因子の発現を誘導すること、一方で閾値を超える負荷は、逆に細胞死やマトリックスの崩壊に伴う変形性関節症などこれら組織や器官に大きな損傷を及ぼすことが知られてきた。さらに近年、軟骨前駆細胞を用いたトランスクリプトーム解析では、数百を超える遺伝子が生理的静水圧の負荷によって発現変動することも報告されてきた。しかしながら、これらの生理学的静水圧の負荷から大規模な転写発現制御に至る分子機序や個体レベルでの分子適応応答についての多くは不明である。

そこで、本研究においてはモデル生物線虫を用いて、1MPa～数十 MPa の生理的静水圧を負荷し、分子応答ならびに生物影響を個体レベルで明らかにすることを行った。

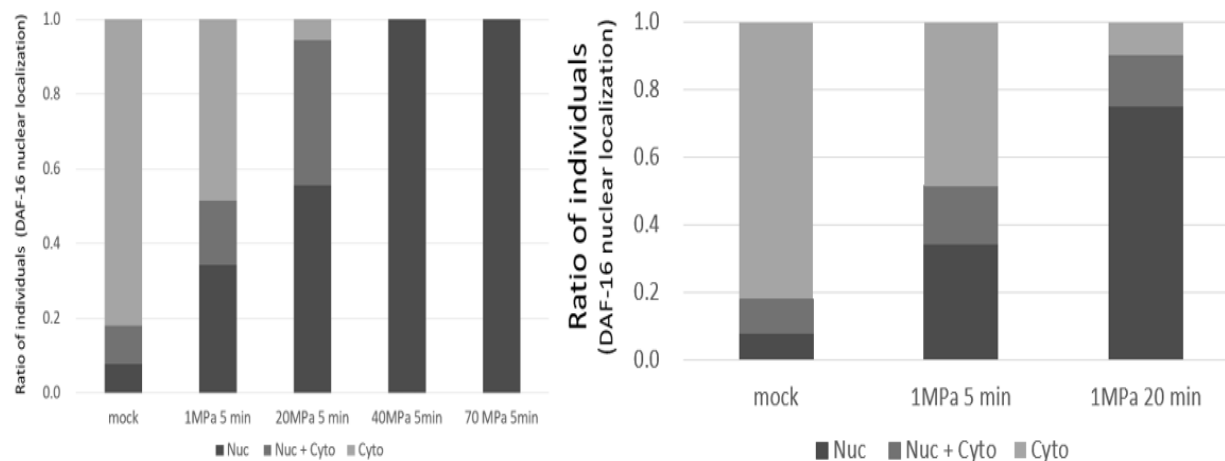
### 【結果・考察】

本研究において、静水圧負荷による DAF-16/FoxO 転写因子の速やかな核移行を高圧力顕微鏡により観察することに成功した。20MPa の負荷では 5 分以内に、40MPa～70MPa では加圧 3 分後には DAF-16::GFP タンパク質の細胞質から核への移行が完了することがわかった（図 1）。また、シリンジ加圧システムを用いた実験においても、同核移行は 1MPa の加圧でも観察され、5 分後には約半数の個体で、20 分の加圧でほぼすべての個体で核移行することが明らかになり、静水圧負荷に伴う量的、時間的な DAF-16 の活性化機構の存在を明らかにした（図 2）。



静水圧負荷（70MPa）による DAF-16 の核移行と加圧開放（+表記）に伴う細胞質への再移行

図 1



静水圧負荷により量的/時間的变化に応じた DAF-16 の核移行

図 2

DAF-16 は栄養飢餓や酸化ストレス、熱ストレスなど様々な外部環境に応じて、核移行し活性化されることが知られてきたが、いずれの系においても、核移行には数十分から数時間の処理時間を要することが報告されていた。また、遠心機による活性化では 3 時間 100G の過重力を必要として、この際には、MEC-4/MEC-10 ならびにセロトニンを介したメカノ神経伝達システムを必要とすることも報告されていた。一方で、今回見出した静水圧負荷による活性化では、数分内で核移行が完了すること、さらに、加圧を開放することで速やかに細胞質へ再移行すること、MEC-4/MEC-10 の RNAi ならびにセロトニンの過剰投与によっても核移行が進行したこと、これまでに報告のある上記活性化とは大きく異なることも示唆された。一方で、酸化ストレスによる DAF-16 の核移行に必須の transportin/IMB-2 は、静水圧負荷による核移行においても必須であることが RNAi による逆遺伝学的解析により示された。

次に、野生型 N2 と *daf-16* 欠損変異体 CF1038 株に対して、10MPa 前後の静水圧を 5 分間負荷し、その後、30 分、2 時間培養後の遺伝子発現の変動（3 反復）を DNA マイクロアレイ法により調べた。その結果、野生型 N2 において、有意な発現がみられた全 11331 遺伝子のなかで 5 分加圧処理、30 分後に、2 倍以上発現が変動した遺伝子は 10 遺伝子（上昇）と 506 遺伝子（低下）であった。一方、同条件下の *daf-16* 変異体では、2 遺伝子（上昇）と 8 遺伝子（低下）で、N2 と共通のパターンを示したものは低下の 2 遺伝子のみであった。2 時間後においては、N2 で 43 遺伝子（上昇）と 813 遺伝子（低下）、*daf-16* では 19 遺伝子（上昇）と 652 遺伝子（低下）の変化がみられたが、共通するものは 2 遺伝子（上昇）と 140 遺伝子（低下）であった。すなわち、静水圧負荷直後においては、DAF-16 の制御による転写抑制が数百の遺伝子で生じることが明らかになった。また、30 分後に変化のみられた 516 遺伝子のなかの 211 遺伝子は、DAF-16 dauer regulome や *daf-2* 変異体において upregulated gene とのデータベース情報もあり、静水圧負荷により核移行した DAF-16 に依存した発現変動が生じた可能性が強く示唆された。今回、変動がみられた遺伝子には、Activated in Blocked Unfolded protein response *abu* 遺伝子やその orthologs ならびに 24 のコラーゲン *col* 遺伝子、14 の C-type レクチン *clec* 遺伝子などが含まれていた。また、1 回の実験ではあるが 40MPa 5 分間処理を行い 24 時間後のマイクロアレイ解析では加圧直後に発現低下した約 1/4 の遺伝子で発現誘導がみられ、それらには *abu*、*col* なら

びに *clec* 遺伝子が含まれていたことから、一過的な静水圧の負荷は DAF-16 の速やかな核移行、活性化により、その制御遺伝子の発現抑制、その後、しばらくして転写の活性化に転じることが示された。

また、L1 幼虫期から継続して、毎日、1 回 1MPa、5 分間の処理を行ったところ、コントロール区と比較して、野生型 N2 においては有意な寿命の延長効果を確認し、また、*daf-16* 変異体においてはその効果があまり顕著でないことも明らかにすることができた。

一方、ミトコンドリアの様子が GFP で蛍光観察可能な SD1347 株を用い、40MPa 静水圧を 1 時間負荷し、静水圧加圧負荷がメカノストレスとしてどの程度のレベルで筋繊維に影響を及ぼすかミトコンドリアの形態変化の観察を行ったところミトコンドリアの断片化が見られた。静水圧負荷を止めてから 20 分後、3 時間後、8 時間後にミトコンドリアの形態を調べると、ミトコンドリアと核の崩壊が見られる状態である cell death の状態はもちろん、GFP シグナルの低下が見られ円形のミトコンドリアが増加する swelling の状態には至らない軽度のメカノストレスであるが断片化することが判明した。この断片化は静水圧負荷から解放されるとミトコンドリアの断片化が時間の経過とともに修復に向かう傾向を認めることができた。また、大気圧から 70MPa 程度に静水圧を負荷することで、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の指標として利用される GCaMP3.35 を筋細胞特異的に導入した HBR4 株を用いて観察した結果、線虫は 70MPa の静水圧の加圧により運動性を完全に失い、その体は棒状になるが 70MPa に達するまで  $\text{Ca}^{2+}$ の放出が認められ、70MPa でカルシウムイオンが大量に放出される現象を見出した。同様に 70MPa の静水圧から解放されるときも  $\text{Ca}^{2+}$ の大量放出が認められた。これらの静水圧負荷に伴う生物応答は、咀嚼時に瞬間的に加わる静水圧である 40MPa や 70MPa を 1 時間連続して加え続けることが、もはや生理的静水圧とは言えず、生物応答としては負の方向に導くメカノストレスであると判断できる。

以上の結果から、これまで知られていなかった静水圧負荷に伴うシグナル伝達において、FoxO/DAF-16 転写因子の速やかな核移行が生じること、また、その際には、一過的に、多くの転写抑制を来すこと、加圧が開放された後しばらくしてこれら遺伝子領域では再活性化が生じることが、線虫を用いた実験から明にすることができた。このことは、これまでヒトやマウスの培養細胞、軟骨組織などを用いた静水圧負荷の研究においてコラーゲンをはじめとするマトリックスタンパク質の発現変動と、さらに FoxO の knockout マウスにおいて軟骨の異常や変形性関節症の報告がなされていたが、今回の線虫の静水圧負荷に伴う FoxO/DAF-16 の直接的な核移行現象が、これら哺乳類における現象を結びつけるものに発展することが期待される。

また、静水圧負荷に伴う DAF-16 の核移行は、短時間での移行性ならびにその一過性の特徴、また DAF-16 の核移行に関する作業仮説として、unfolding response 関連遺伝子の発現変化から、本来、細胞質に留まっていたリン酸化型 DAF-16 が静水圧負荷により構造変化を来して、リン酸化状態のままで IMB-2 の働きにより核移行するメカノトランスダクションが生じた可能性を考えている。また、200MPa 程のより高い静水圧負荷では、広く生体膜やタンパク質成分が不可逆的に変性することも知られており、FoxO/DAF-16 ファミリーは、より低い圧変化にも応答するタンパク質分子である可能性も考察され今後の研究が待たれる。

## 論文審査結果の要旨

歩行・運動・咀嚼などの行動には、大気圧条件である 0.1MPa よりもその 10 倍から数百倍の大きさである 1MPa～数十 MPa（メガパスカル）単位の静水圧（以下、生理的静水圧とする）の負荷がかかっている。すなわち筋、骨、関節や歯茎など様々な組織や器官において、我々は単発的あるいは持続的に生理的静水圧の負荷を受けながら生命活動を日々営んでいる。このように通常の生活で身近なメカノストレスの 1 つである生理的静水圧の負荷は、これら組織や器官の恒常性の維持や強化に不可欠であることが知られている。しかしながら、これらの生理学的静水圧の負荷から恒常性の維持や強化に資する転写発現制御に至る分子機序や個体レベルでの分子適応応答についての多くは不明である。

本研究においてはモデル生物線虫を用いて、1MPa～数十 MPa の生理的静水圧を負荷し、分子応答ならびに生物影響を個体レベルで明らかにすることを行った。その結果、静水圧負荷による FoxO/DAF-16 転写因子の速やかな核移行を高圧力顕微鏡により観察することに成功した。遺伝子発現の網羅的な解析から、静水圧負荷直後においては、DAF-16 の制御による転写抑制が数百の遺伝子で生じることも明らかにした。その後、しばらくしてコラーゲンや繊維毛に関わる遺伝子群の転写の活性化に転じることも見出した。以上の結果から、これまで知られていなかった静水圧負荷に伴うシグナル伝達において、FoxO/DAF-16 転写因子の速やかな核移行が生じること、また、その際には、一過的に、多くの転写抑制を来すこと、加圧が開放された後しばらくしてこれら遺伝子領域では再活性化が生じることが、線虫を用いた実験からはじめて明らかにすることができた。このことは、これまでヒトやマウスの培養細胞、軟骨組織などを用いた静水圧負荷の研究においてコラーゲンをはじめとするマトリックスタンパク質の発現変動と、さらに FoxO の knockout マウスにおいて軟骨の異常や変形性関節症の報告がなされていたが、今回の線虫の静水圧負荷に伴う FoxO/DAF-16 の直接的な核移行現象が、これら哺乳類における現象を結びつけるものに発展するものと期待している。

以上の成果は、渡辺尚氏が、自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。従って、同氏の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。